

RICKETTSIEMIA EXPERIMENTAL DA FEBRE MACULOSA DO BRASIL

A. VALLEJO-FREIRE e A. BRUNNER JR.

*Serviço de Microscopia Eletrônica, Secção de Virulogia, Instituto Butantan,
São Paulo, Brasil*

INTRODUÇÃO

Apesar de constantes tentativas realizadas em esfregaços corados pelos métodos de Giemsa e Macchiavello, a rickettsia da Febre Maculosa do Brasil não foi até o presente momento identificada morfológicamente, quer no sangue de cobaios utilizados para passagem do vírus, quer em experiências de laboratório.

Lemos Monteiro (1) concluiu que o agente infeccioso existe sob a forma granular no meio circulante, representando uma das fases da evolução da rickettsia.

Trabalhando com macacos e cobaios infectados com Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, Ricketts (2) descreveu em 1909, em preparações coradas pelo Giemsa, corpúsculos em forma de diplococos e, por vèzes, em formas bacilares. Estas partículas, encontradas com freqüência no sangue dêstes animais, eram menos constantes no sangue dos doentes, onde só puderam ser localizadas mediante a concentração do sôro. Em ovos de *Dermacentor* sp. foram encontradas formações, que mostraram ser específicas em provas de aglutinação com sôro imune de cobaios.

Nicolle, Blanc e Conseil (3) não observaram forma microbiana alguma em sangue de cobaios infectados experimentalmente com Tifo Exantemático Europeu. No sangue de doentes, Rocha Lima (4) encontrou partículas suspeitas apenas em leucócitos, que, quanto à forma, tamanho e afinidade tintorial se assemelhavam à *Rickettsia prowazeki*.

No presente trabalho apresentamos eletromicrografias de sangue de cobaios infectados experimentalmente com Febre Maculosa do Brasil, e analisamos o significado das partículas suspeitas.



MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado sangue de animais no segundo e terceiro dias do período febril, obtido por punção cardíaca. As provas de esterilidade eram feitas em tioglicolato, caldo simples e Sabouraud. As provas de atividade consistiam na inoculação intraperitoneal de 1 ml de sangue, fazendo-se, no fim do período febril das cobaias de prova, esfregaços peritoncais corados pelo método de Macchiavello.

Titulações — Eram determinadas pelo método de Reed e Muench, as DI_{50} , do sangue íntegro citratado, do sangue hemolisado, obtido por congelamento a $-20^{\circ}C$ e descongelamento e do plasma obtido por centrifugação a 500 g durante 15 minutos.

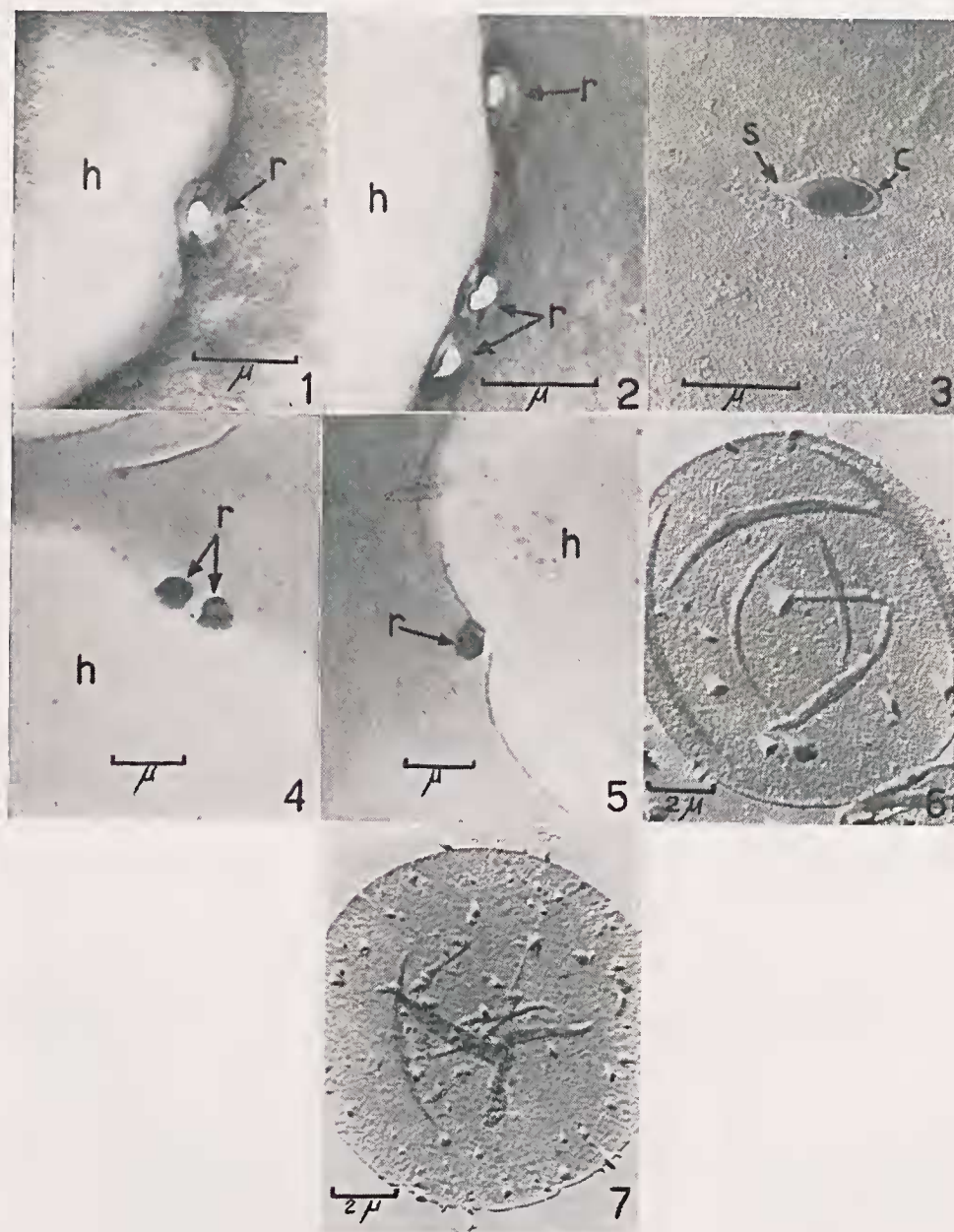
Réplicas — Imediatamente após o preparo dos esfregaços de sangue, para exame ao microscópio eletrônico, faziam-se fixações por vapores de ácido ósmico. Decorridos 40 a 60 minutos, os esfregaços eram mergulhados em solução de colódio a 1% em acetato de amila e mantidos em posição inclinada na estufa a $40^{\circ}C$ durante 30 a 40 minutos. Em seguida, os filmes eram destacados dos esfregaços por meio de fitas gomadas de 5 mm de largura, aderidas aos mesmos, em posição perpendicular ao comprimento da lâmina. A fita gomada, com uma abertura quadrada de aproximadamente 3 mm de lado, era destacada juntamente com o filme. O filme correspondente à região da abertura era colocado, em posição invertida, sobre uma grade metálica, previamente mergulhada numa solução diluída de goma em éter de petróleo.

Hemólise — A 10 ou 15 ml de água destilada era adicionado 1 ml de sangue. Dez minutos após, adicionava-se 1 ml de solução aquosa de ácido ósmico a 1%, prosseguindo a fixação por 10 a 15 minutos. As hemácias hemolisadas eram lavadas com água destilada, por meio de centrifugações e decantações sucessivas até a obtenção de um sobrenadante incolor. A suspensão de estromas era gotejada sobre grades metálicas previamente cobertas com um filme de colódio e o excesso de líquido da gôta retirado por absorção em papel de filtro.

As preparações eram submetidas ao sombreamento metálico com cromo e examinadas num microscópio eletrônico Siemens ÛM 100b, a 60 KV, com aumentos de $\times 7200$.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Tôdas as partículas suspeitas observadas dispõem-se nos bordos da hemácia e, com freqüência, numa reentrância, como se o glóbulo vermelho tivesse sido comprimido. Nas figuras 1 e 2 observam-se réplicas de partículas suspeitas, com a região central aparentemente sem colódio. Este aspecto está em concordância com



Figs. 1 and 2 — Replica of rickettsiae (r) disposed on the borders of the red blood corpuscles (h). The central region of the replica of particles presents a hole corresponding to the height of the rickettsia.

Fig. 3 — Rickettsia from a preparation of hemolysed blood, containing a capsule (c); the long shadow (s) shows the pronounced height of the particle.

Figs. 4 and 5 — Pseudoreplicas containing rickettsiae (r) situated in a concavity on the borders of the red blood corpuscles (h). The shadows are not long because the particles are partially embedded in collodium.

Figs. 6 and 7 — Hemolysed red blood corpuscles with particles, of variable dimensions and constant form, adsorbed on the stromas.

a morfologia da rickettsia, como se verifica na figura 3. O sombreamento metálico indica uma acentuada saliência da região central da partícula, sendo possível que parte do colódio possa ficar aderido nessa região quando o destaque da réplica é feito.

Estas partículas medem no seu eixo maior, de 720 a 620 $m\mu$ e no eixo menor, de 540 a 330 $m\mu$. As medidas feitas nas réplicas, não correspondem exatamente às medidas reais da partícula, se se considerar as tensões que sofrem as mesmas, quando destacadas do esfregão e as devidas ao bombardeio eletrônico, quando são submetidas ao exame.

Nas figuras 4 e 5 verifica-se um aspecto diferente dos anteriores, devido ao fato de terem as partículas se destacado do bordo das hemácias, permanecendo incluídas no colódio. Nêstes casos foram obtidas somente as réplicas das hemácias, que mostram também a disposição das partículas em reentrâncias. Estas partículas medem $390 \times 480 m\mu$.

Formas bacilares, como as que se observam em esfregaços peritoneais e de membrana do saco vitelino corados pelo Macchiavello, nunca foram surpreendidas no sangue de cobaios, mas apenas formas cocoidais isoladas (Figs. 1 e 4) ou próximas, que dariam o aspecto de diplococoidais ao microscópio óptico (Figs. 2 e 5).

As dimensões, a forma, a disposição das partículas em relação à hemácia e o título relativamente baixo do sangue ($DL_{50} = 10^{-2,15}$), são fatores que podem explicar as dificuldades na observação da rickettsia em esfregaços de sangue ao microscópio óptico.

Suspensões de glóbulos vermelhos hemolisados foram examinadas com o objetivo de concentrar as partículas presentes no sangue, desde que estivessem adsorvidas aos estromas das hemácias. Nas figuras 6 e 7 observam-se estromas nos quais estão adsorvidas partículas de forma constante, porém, de dimensões que variam de $98 \times 146 m\mu$ a $200 \times 630 m\mu$. O sombreamento metálico triangular, cujo vértice corresponde aproximadamente ao centro das partículas, indica uma saliência nesta região, à semelhança do que se observa nas rickettsias. Estas partículas não apresentam um envoltório ou cápsula visível como a rickettsia da figura 3. Embora não tenham sido observadas em sangue de cobaios normais, não se pode acreditar ainda na sua participação num processo de desenvolvimento que a rickettsia provavelmente apresenta, levando-se em conta o seu pleomorfismo. Nestas preparações nunca foram observadas formas típicas de rickettsia em estromas de hemácias, mas apenas isoladas. É possível, pois, que além da rickettsia não ser adsorvida pelos estromas, seja também destacada da hemácia durante o processo de hemólise osmótica. A aderência da partícula ao glóbulo vermelho seria mantida somente no sangue íntegro. Isto está de acordo com observações feitas por Vallejo-Freire (5), de que ocorre um aumento do título no sangue, mantido a baixa temperatura ($4^{\circ}C$) para conservação, quando se processa, em decorrência, uma hemólise. Este fato pode ser explicado por uma distribuição mais

homogênea de rickettsias nas amostras quando duas ou três partículas aderidas a uma hemácia se destacam, considerando-se possível o processo de desencadeamento da infecção por uma única rickettsia. A DL_{50} do sangue hemolisado por congelamento e descongelamento foi de $10^{-2,7}$, o que corrobora as considerações feitas acima.

RESUMO

Não tendo sido possível observar ao microscópio óptico o agente etiológico da Febre Maculosa do Brasil na fase circulante, foram feitos exames de esfregaços de sangue pelo método de réplicas. As rickettsias, geralmente granulares, se dispõem nos bordos das hemácias e medem $390 \times 480 \mu$.

O baixo título, a forma e dimensões e sua disposição em relação às hemácias são fatores que dificultam sua observação pelos métodos clássicos.

SUMMARY

It was not possible to observe the etiological agent of the Brazilian Spotted Fever in the circulatory blood at the optic microscope, therefore, blood smears were examined at the electron microscope by the replication method. The generally granular rickettsiae dispose themselves on the borders of the red blood corpuscles and measure about $390 \times 480 \mu$.

The low title, form and dimensions and the disposition in relation to the red blood corpuscles, are factors that make the observation by the classical methods difficult.

BIBLIOGRAFIA

1. *Lemos Monteiro, J.* — Tifo Exantemático de São Paulo. IX — "Rickettsioses" e seu conceito pluralista. *Brasil Médico*, 46:361-362, 1932.
2. *Ricketts, H. T.* — A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain Spotted Fever. *J. Am. Med. Assoc.*, 52(5):379-380, 1909.
3. *Nicolle, C.; Blanc, G. et Conseil, E.* — Quelques points de l'étude expérimentelle du Typhus Exanthématique. *C. R. Acad. Sciences*, 159(19):661-664, 1914.
4. *Rocha Lima, H. da* — Contribuição à etiologia do Tifo Exantemático. *Berl. Klin. Wochschr.*, 53(21):567-569, 1916.
5. *Vallejo-Freire, A.* — Observações não publicadas.



SciELO